

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-60761

(43) 公開日 平成 5 年 (1993) 3 月 12 日

(51) Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G01N 33/58		A 7055-2J		
C12Q 1/68	ZNA	A 8114-4B		
G01N 33/50		P 7055-2J		
33/53		M 8310-2J		
33/535		8310-2J		

審査請求 未請求 請求項の数20 (全 5 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平3-300002	(71) 出願人	591255450 株式会社イムノバイオン 北海道札幌市北区篠路町上篠路81番38号
(22) 出願日	平成 3 年 (1991) 8 月 30 日	(72) 発明者	三和 茂 札幌市北区篠路町上篠路81番38号

(54) 【発明の名称】 重合体の分析方法

(57) 【要約】

【目的】 非結合の標識された低分子と標識された分析対象物質を簡易な方法で短時間に分離し、それを分析すること。

【構成】 重合体を結合させた不溶性担体により、試料中の低分子物質を吸着させ分析対象物質である非吸着の重合体を分離しその重合体を分析する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 重合体を結合させた不溶性担体により、試料中の低分子物質を吸着させ分析対象物質である非吸着の重合体を分離することを特徴とする重合体の分析方法。

【請求項2】 不溶性担体に結合する重合体が、生体高分子又は、化学合成物であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】 生体高分子が核酸であることを特徴とする請求項2に記載の方法。

【請求項4】 核酸がDNAであることを特徴とする請求項3に記載の方法。

【請求項5】 不溶性担体が吸着剤であることを特徴とする請求項1から請求項4に記載の方法。

【請求項6】 吸着剤が活性アルミナ又は活性炭素を含むことを特徴とする請求項5に記載の方法。

【請求項7】 試料中の低分子物質が分析対象物質より低分子量であること又は偏比容が大きいことを特徴とする請求項1から請求項6に記載の方法。

【請求項8】 低分子物質として少なくともオリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド又は蛋白質が含まれることを特徴とする請求項7に記載の方法。

【請求項9】 蛋白質が標識抗体であることを特徴とする請求項8に記載の方法。

【請求項10】 オリゴヌクレオチド或いはポリヌクレオチドがハイブリダイゼーションするための標識プローブであることを特徴とする請求項8に記載の方法。

【請求項11】 分析対象物質である非吸着の重合体が核酸であることを特徴とする請求項1から請求項10に記載の方法。

【請求項12】 核酸が標的ヌクレオチド配列と標識プローブとがハイブリッドを形成したものであることを特徴とする請求項11に記載の方法。

【請求項13】 核酸が抗原またはリガンドを結合したものであることを特徴とする請求項11に記載の方法。

【請求項14】 抗原抗体反応において、抗原を結合した核酸と標識抗体を競合させることにより非標識抗原量を分析することを特徴とする請求項13に記載の方法。

【請求項15】 抗原がハプテンであることを特徴とする請求項13又は請求項14に記載の方法。

【請求項16】 標識化するための標識物質は、直接的または間接的に結合させた酵素、蛍光性物質、発光物質、色素、補酵素、ハプテン、放射性同位元素又は酵素サイクリング反応が可能な基質であることを特徴とする請求項9、請求項10、請求項12又は請求項14に記載の方法。

【請求項17】 酵素がトリオースホスフェートイソメラーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリ性フォスファターゼ、酸性フォスファターゼ、及びβ-ガラクトシダーゼから選ばれることを特徴とする請求項16に記載の方

法。

【請求項18】 核酸が酵素の基質又は誘型となることを特徴とする請求項11に記載の方法。

【請求項19】 酵素がDNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、ターミナルトランスフェラーゼ、ポリヌクレオチドキナーゼ、ヌクレアーゼS1又はリガーゼから選ばれることを特徴とする請求項18に記載の方法。

【請求項20】 核酸の塩基数が1万塩基以上であることを特徴とする請求項11から請求項19に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は分子遺伝学、生化学及び免疫化学の分野に関する。さらに詳しくは、本発明は、重合体を結合させた不溶性担体による分析対象の重合体の分離及びその分析方法に関する。

【0002】

【従来の技術】一般に核酸類の塩基配列の相同性を調べるためにハイブリダイゼーションが行われる。ハイブリダイゼーションは相補的塩基対形成に基づいているため、適切な条件下ではDNAの点突然変異、挿入又は欠失などの存在をみつけることが可能である。このことは、遺伝子病を診断するのに非常に重要である。核酸ハイブリッド形成を検出する方法として電子顕微鏡による観察、固体支持体を使用した方法、電気泳動法及び濾過法などがある。

【0003】又、抗原抗体反応を定量的に測定するのには、数多くの方法が開発されている。例えば、免疫拡散法、レーザーネフエロメトリー法、特に高感度の標識免疫測定法などがある。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】DNA上に相同な配列、異なる配列などを位置づけるために、ヘテロ2本鎖DNA形成法を用いた電子顕微鏡による観察は、試料の調節など特殊な技術を必要とするため一般的ではなく、また点突然変異の検出は極めて難しい。

【0005】標的核酸をニトロセルロース膜、ナイロン膜などの固体支持体に固定し、適切な標識プローブとハイブリダイゼーションする方法は、固相と液相上での反応であるため長時間反応させる必要があることと非特異的結合を除去するために注意深く未反応のプローブを洗浄する必要性があり、多大の労力と時間がかかるなどの問題点がある。

【0006】核酸ハイブリッド形成物と未反応の標識プローブとの分離は、分子ふるい効果のある電気泳動法、ゲル濾過法などで容易に行えるが、時間がかかるため多数検体のスクリーニングは難しく自動分析化が困難である。

【0007】抗原抗体反応においては、免疫拡散法、レーザーネフエロメトリー法は、複合体の沈殿物を測定す

るため感度や便利さに限界がある。

【0008】又、高感度な標識免疫測定法は標識として赤血球、放射性同位元素、酵素、蛍光物質又は金属などが利用されているが、標識した抗原（又は抗体）と抗体（又は抗原）との結合した複合体と非結合標識抗原（又は抗体）とを分離しなければならない。その際、極めて微量な物質を定量する場合に超高感度な酵素免疫測定法が用いられるが、分離の時に非特異的な吸着が大きな問題となる。

【0009】本発明は、核酸、抗原抗体反応、酵素、アインザイムの分別定量などの分析において、夾雑物の除去、時間の短縮、分析操作の簡便化、非特異的な吸着を無くすこと、定量性、高感度、低価格を実現し、マス・スクリーニング及び自動分析を可能にすることなどを目的としている。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記目的を達成するために鋭意研究の結果、予め不溶性担体に重合体を飽和状態になるように結合させておくことにより、試料中の低分子はその影響を受けずに吸着するが分析対象物質の重合体は吸着しなくなることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0011】即ち本発明は、予め重合体を結合させた不溶性担体により、試料中の低分子物質を吸着させ分析対象物質である非吸着の重合体を分離することの特徴とする重合体の分析方法に関するものである。

【0012】以下に、本発明を詳述する。不溶性担体に結合させる重合体は、オリゴマー又は高重合体でも良く、具体的には天然ポリマーとしてセルロース、デンプン、蛋白質、核酸、又はこれらの化学修飾した天然ポリマー等がある。更に、化学合成物として合成繊維、合成樹脂などがある。核酸はコスト面から大量に存在するものが望ましく、鮭や鯨などのような精子由来のもの、培養可能な細菌類由来、ファージ又はウイルス等精製過程での機械的切断がわりと少ないものがよい。

【0013】該重合体の重合度は、試料中の吸着させようとする低分子物質の分子量又は偏比容により異なり特に立体構造の影響を受けるためその限界は明確ではないが、該重合体の分子全体の大きさが該低分子の分子全体の大きさよりも大きいことが最低必要条件となる。即ち、該重合体の重合度は2個以上、望ましくは5000個以上であるが、試料中の低分子物質の種類によりすべて違う。

【0014】重合体を不溶性担体に結合させる結合方法には、共有結合又は水素結合、疎水性相互作用、イオン結合、ファン・デル・ワールス相互作用などの非共有結合による物理的吸着があるが、いずれの結合方法でもよい。

【0015】不溶性担体としては、ポリスチレン、ポリエチレン、ニトロセルロース、ナイロンなどの合成樹

脂、リボソーム類、リン脂質粒子などの天然物、又はガラス、シリカゲル、磁性体、セラミックス、セライト、活性アルミナ、活性炭素などの無機材質の吸着剤があるが、これらに限定されるものではない。又、不溶性担体は少なくともこれらの吸着剤を含むことが好ましい。

【0016】試料中の低分子物質は、不溶性担体に結合させる重合体又は分析対象物質よりも分子量が小さく、又は有機物質であることが望ましい。特に、該低分子物質は一般的には標識物質を含むものであるが、ただ単に夾雑物質だけでも何等問題は無い。低分子物質としてはオリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、蛋白質、又は標識化するための標識物質としては放射性同位元素、蛍光性物質、発光物質、色素、酵素、酵素阻害剤、ハプテン、酵素サイクリング反応が可能な基質又は補酵素などが挙げられる。より具体的には、オリゴヌクレオチドとして数十塩基ぐらいの特定配列のプロープ等、蛋白質としては標識抗体、標識抗原、標識受容体等、酵素類などがある。次に標識物質となる蛍光性物質としては、エチジウムブロマイド、フルオレセイン、ローダミン、ウンベリフェロン等があり、標識酵素としては、トリオースホスフェートイソメラーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリ性フォスファターゼ、酸性フォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ及びβ-ガラクトシダーゼ等がある。

【0017】試料中の分析対象物質である非吸着の重合体は、不溶性担体に結合させる重合体と同じ種類でも異なる種類でもどちらでも良く、非吸着の重合体の方の分子量はより大きいことが好ましい。具体的には、該重合体としてはセルロース、デンプン、蛋白質、核酸、可溶性の合成繊維又は合成樹脂などがあるが、ここでは主に核酸に関して重点的に詳述する。

【0018】試料中の核酸は天然、合成或いは修飾されたDNA又はRNAであり、一本鎖又は二本鎖いずれでも良い。該核酸の塩基数は1万以上が好ましい。一般に該核酸は適当な検出システムにより分析されるが、多くの場合、標識プロープが用いられる。それ故、核酸の標的ヌクレオチド配列と標識プロープは適切な温度下でハイブリダイゼーションが行われる。検出に用いられるプロープはビオチンで標識されたものが望ましい。ビオチン標識プロープとハイブリッドを形成した核酸は、酵素標識したアビジンと更に複合体を作るが、それらは重合体を結合した不溶性担体には吸着しないため分析可能となる。

【0019】核酸は、該核酸に直接的に又は間接的に抗原またはリガンド等を結合させ、抗体又は受容体を定量することも可能である。この場合には、検出系として2番目の標識抗体を用い、サンドイッチ法的に分析する必要がある。又同様な系を利用して、抗原を結合した核酸と標識抗体を競合させることにより非標識抗原量を分析することもできる。リガンドの場合も前記と同様である。定量できる抗原又はリガンドとしては甲状腺刺激ホ

ルモン、サイロキシン、成長ホルモン、インスリン、胎盤性ゴナドトロピン、ステロイドホルモン、薬物類などの代表例がある。

【0020】核酸を基質又は鋳型にする酵素には、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、ターミナルトランスフェラーゼ、ポリヌクレオチドキナーゼ、ヌクレアーゼS1、リガーゼ又は制限酵素などがある。これらの酵素およびDNA結合タンパク質は核酸と結合できるため、前記と同様に分析することができる。例えば、ターミナルトランスフェラーゼ活性測定の場合には、天然のDNAを基質として、3'側にビオチンを結合させたデオキシヌクレオチド3リン酸を酵素作用により結合させ、その時の結合したビオチンを定量すれば良い。

【0021】分析対象物質の非吸着の重合体に結合した標識物質と不溶性担体との分離手段は遠心分離、カラム又はフィルター等がある。

【0022】

5' -GTTGGAGCTGGTGGCGTAGG-3' (Gly)
 5' -GTTGGAGCTCGTGGCGTAGG-3' (Arg)
 5' -GTTGGAGCTTGTGGCGTAGG-3' (Cys)
 5' -GTTGGAGCTAGTGGCGTAGG-3' (Ser)
 5' -GTTGGAGCTGCTGGCGTAGG-3' (Ala)
 5' -GTTGGAGCTGATGGCGTAGG-3' (Asp)
 5' -GTTGGAGCTGTTGGCGTAGG-3' (Val)

【0025】(末端ビオチン化プローブの調製) 前記のプローブは終濃度0.2Mカコジル酸カリウムpH6.6、10μMプローブ、2.5mM塩化コバルト、500U/mlターミナルトランスフェラーゼ、30μMビオチン-16-dUTP、37度10時間反応の条件下で末端をビオチン化された。

【0026】(ハイブリダイゼーションおよび検出) 0.5mg/ml 鮭DNA、80mM塩化ナトリウム、20mMリン酸ナトリウムpH7.0、10nM末端ビオチン化プローブ混合液をエッペンドルフチューブに入れ、沸騰水で5分間加熱し室温に放置した。室温5分後にペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン(アマシャム)を1000倍希釈になるように添加した。30分後に試料100μlを活性炭素カラムに加え2ccの0.5M硫酸アンモニウム、1mMEDTA、pH7.2溶液で溶出した。溶出時間は5分以内に終わる。この溶出液に更に発色剤(2mMTMBZ、10mM過酸化水素、クエン酸/リン酸塩緩衝液pH4.6)を2cc加えて20分後に比色計(650nmにて)で測定し、下記の表1の結果が得られた。

【0027】

【表1】

【作用】低分子物質と分析対象物質の標識された重合体を含む混合物が試料となる場合において、この試料を重合体を結合させた不溶性担体に加えると低分子物質がこの担体に吸着され標識された重合体だけが分離される。その後、これを適切な検出システムを用いて分析する。

【0023】

【実施例1】

(DNA結合担体の調製) クロマトグラフィ用活性炭素(和光純薬)100gに1mg/mlの鮭のDNAを200ml加えた。室温で1昼夜おいた後、0.5M硫酸アンモニウム、1mMEDTA、pH7.2溶液で洗浄した。この様に処理された活性炭をベッド体積が2ccになるようにカラムに詰めた。

【0024】(点突然変異を検出するためのプローブ) 下記の7種類のプローブは宝酒造から購入したもので、c-Ki-ras遺伝子の12番目のアミノ酸コドンに点突然変異をもつ。

条件

比色計の吸光度

プローブ(Gly)	0.148
プローブ(Arg)	0.066
プローブ(Cys)	0.068
プローブ(Ser)	0.072
プローブ(Ala)	0.048
プローブ(Asp)	0.076
プローブ(Val)	0.060
プローブ含まず	0.052

【0028】上記の結果からわかるように、本方法はゲノムDNAの点突然変異に関して、非常に特異的で感度の高いアッセイ系である。又、操作が非常に簡単であり、自動分析が可能である。

【0029】

【実施例2】0.5mg/ml 鮭DNA、80mM塩化ナトリウム、20mMリン酸ナトリウムpH7.0、10nM末端ビオチン化オリゴデオキシシチジル酸(24~36個重合)混合液をエッペンドルフチューブに入れ、沸騰水で15分間加熱し室温に放置した。室温20分後にペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン(アマシャム)を1000倍、2000倍、4000倍、80

00倍希釈になるように添加した。20分後に試料100 μ lを活性炭素カラムに加え2ccの0.5M硫酸アンモニウム、1mM EDTA、pH 7.2溶液で溶出した。この溶出液に更に発色剤(2mM TMBZ、10mM過酸化水素、クエン酸/リン酸塩緩衝液pH 4.6)を2cc加えて15分後に比色計(650nmにて)で測定し、下記の表2の結果が得られた。

【0030】

【表2】

条件	比色計の吸光度
8000倍希釈	0.020
4000倍希釈	0.040
2000倍希釈	0.064
1000倍希釈	0.168

【0031】この結果は加えた酵素濃度に比例しており、本発明においては良好な定量性があることがわかる。この実施例では、ビオチンをリガンド又はハプテンの代わりに、ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジンを受容体又は抗体の代表例として使用しただけである。故に、本発明は抗原抗体反応、リガンドと受容体との結合だけでなく核酸に結合するタンパク質や核酸解析に必要な酵素および血液凝固に関与する酵素の分析など、広

範囲に亘って適用できることは言うまでもない。

【0032】

【発明の効果】上記実施例から明らかなように、本発明は試料を溶液中で調製できるだけでなく、その試料を重合体で結合させた不溶性担体を詰めたカラムに入れて溶出させるだけで短時間で分析できるなど極めて簡易な優れた方法である。この事が多くの検体数の測定を可能にし、従来難しかったマス・スクリーニングと自動分析への適用を可能にした。

10 【0033】本発明の最も特徴的なのは、非結合の標識化された低分子物質、標識化された分析対象物と検出の際に干渉する夾雑物質を含む試料において、重合体で結合させた不溶性担体(特にDNA結合活性炭素)は低分子物質と夾雑物質を特異的に吸着するため、バックグラウンドが少なくなるだけでなく、高感度測定が可能となることである。特に、本発明における標識化された低分子物質とは数十万前後の分子量を有する標識酵素なども含むものである。

【0034】又、本発明において用いられる不溶性担体は無機材質の吸着剤を利用できるため、コストの面が非常に安くなる。

【0035】以上の効果を有する本発明は、極めて画期的な酵素活性測定法、酵素免疫測定法及び遺伝子分析法である。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁵

33/543

識別記号

庁内整理番号

Z 7906-2J

F I

技術表示箇所